

革新的先端研究開発支援事業（インキュベートタイプ）  
事後評価結果および評価コメント

研究開発課題名	がん治療標的探索プロジェクト
代表機関名	国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 分野長
研究開発代表者名	間野 博行
プログラスマネージャー	合川勝二（国立がん研究センター）

【研究開発の概要】

がん臨床検体の機能解析とゲノム解析を統合的に行って以下の知見を得た。急性骨髄性白血病（AML）に根治目的で骨髄移植をしばしば施行するが、移植後の再発白血病が稀に健常なドナー血由来である事がある（ドナー由来白血病：donor cell leukemia, DCL）。その原因は長らく不明なままであったが、我々はDCLの各病期および健常ドナー血を入手できたので、それぞれから全エクソンシーケンスを行った（Leukemia 28:426）。全エクソン中のSNPを比較したところ、再発は元々のAMLクローンではなくてドナー由来であり、DCLである事が確認された。興味深いことにDCLで変異が確認された遺伝子のうちIDH2(R140Q)変異とDNMT3A(V150Gfs)変異は低い頻度（それぞれ7.1%、8.7%）で健常ドナー骨髄にも存在した。そこでこれら遺伝子とNRAS(G13D)変異について、超高深度で再度次世代シーケンサー解析を行ったところ、IDH2変異とDNMT3A変異ともに確実に健常ドナー骨髄中に存在することが明らかになった（それぞれ1.6%と2.1%）。移植後まだDCLに至っていない時期に既にドミナントなクローンに変化し（それぞれ13.4%と25.1%）、DCLが発症すると主要なクローンになった（それぞれ35.5%と73.5%）。またNRASのがん化変異はドナー骨髄中にはなく、移植後新たに加わった体細胞変異と考えられた。つまり一見健常な我々の体内に一部 pre-malignant な細胞クローンが存在する事が明らかになった。

中枢神経原発悪性リンパ腫（Primary Central Nervous System Lymphoma: PCNSL）は中枢神経系に限局する稀な悪性リンパ腫であり、病理学的にびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL）に分類されている。全ての中枢神経系腫瘍の2-3%を占めており、平均生存期間は2-4年と極めて予後不良な疾患である。PCNSLは全身性の転移は稀であり中枢神経系において発症すると考えられるが、一方中枢神経系には二次リンパ組織がなく、どうやって分化が進んだリンパ球の腫瘍が脳で起きるかは謎である。PCNSLが末梢原発か中枢神経系原発かは長きにわたって謎であった。また脳内再発に対し

て有効な薬剤はなく、発がん機構も不明なままであった。我々はこれらの疑問に答えるべく 41 症例の PCNSL 腫瘍組織と末梢血単核球を用いて全エクソン解析を行い、さらに 30 症例の PCNSL 腫瘍組織を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、全身性の DLBCL と同様に aberrant somatic hypermutation (aSHM) が生じており、しかも PIM1 は全例で aSHM が生じていた。また BTG2 も 9 割以上で aSHM が生じており、遺伝子変異の上からは PCNSL は比較的均質な腫瘍と考えられた。また aSHM 以外の非同義変異としては MYD88 のアミノ酸置換変異 (L265P 変異) が多いことが特徴である。全身性 DLBCL における MYD88 変異の頻度は 1-2 割であることから、やはり PCNSL は特徴的なゲノム異常を示すと言える。興味深いことに MYD88 変異をサポートするリードは、腫瘍部のみならず、ペア正常部 (末梢血単核球) にも低い頻度に認められた。末梢血に MYD88 変異があるかを定量的に検証する目的で、デジタル PCR によって測定したところ、MYD88 変異陽性腫瘍の約 1/3 に末梢血でも MYD88 変異が確認された。一方、腫瘍において MYD88 変異よりもアレル頻度の高い変異について末梢血で測定するとそれらは存在しなかった。以上のことより、まず二次リンパ組織のある末梢血で MYD88 変異リンパ球 (前がん細胞) が生じ、それが中枢神経系に入って付加変異を生じて PCNSL が発症すると考えられた。

ER 陰性、PGR 陰性、HER2 増幅なしの乳がんはトリプルネガティブ乳がん (triple-negative breast cancer: TNBC) と言われ、現在有効な分子標的療法が存在しない。また TNBC には有望な治療標的も同定されていないのが現状です。我々は TNBC に対して全ゲノム解析を行い、多くのがん遺伝子変異を新たに発見した。特に NFKB1 遺伝子はこれまでがん化変異が知られておらず、この度新たに N580S アミノ酸置換が形質転換能を有していることを発見した。その他、NOTCH1、ERBB2、RRAS2 遺伝子のがん化体細胞変異や、FGFR3-CAT 融合型がん遺伝子を TNBC で発見することに成功した。新たな TNBC の治療法開発に有用な発見であったと思われる。また全ゲノム解析を行ったことで、tumor growth factor alpha (TGFA) 遺伝子の上流にゲノム再構成があり、その結果 TNBC で TGFA が強発現していることを新たに発見した。TGFA の高発現はその受容体である EGFR の活性を誘導し、TNBC 細胞の増殖に関わると考えられる。従って TGFA 高発現 TNBC に対しては、EGFR 阻害剤が新たな治療薬になると期待される。

AYA 世代 (思春期および若年成人、16 才-39 才) のがんの多くは原因不明である。B 細胞性急性リンパ性白血病 (B-ALL) は、AYA 世代で最も罹患人口が多いがん種の一つであるが、AYA 世代 ALL には高頻度の染色体転座が存在せず、AYA 世代 ALL の約 85% は原因不明なままであった。我々は、AYA 世代 ALL のがん化メカニズムを解明するべく、BCR-ABL1 融合遺伝子陰性の AYA 世代 ALL 試料症例について、次世代シーケンサーによる網羅的ゲノム解析を行った。その結果、驚くべ

きことに B-ALL の約 65%の症例が、何らかの融合型がん遺伝子を有することを発見し、しかも最も多く見られたのは全く新しいがん遺伝子 DUX4-IGH 融合遺伝子であった。DUX4 は健常者の体細胞では発現していないが、AYA 世代 B-ALL においては、DUX4 遺伝子が、3' 側が削れた上で免疫グロブリン遺伝子 H 鎖（以下、IGH）座に挿入されて融合し、免疫グロブリン遺伝子転写調節領域の強力な作用によって大量の DUX4-IGH の融合タンパクが産生されることが明らかになった。DUX4-IGH 融合タンパクをネズミの B 細胞で発現させるとネズミは白血病を発症すること、また DUX4-IGH を持っている B-ALL 細胞株で DUX4-IGH の発現を低下させると細胞死が誘導されることも新たに明らかになり、DUX4-IGH は B-ALL の優れた治療標的であることが今回、証明された。

がんゲノム医療が日本で開始される予定であることを受け、ゲノム医療に関する日本発の技術開発を行った。まずがんのゲノム医療の基本であるがん遺伝子解析パネル「Todai OncoPanel (TOP パネル)」を独自に開発した。TOP パネル検査は、450 以上の遺伝子の変異、増幅を検出する DNA パネルと、450 以上の遺伝子の融合転写産物等を検出する RNA パネルで構成され、融合遺伝子も高い精度・感度で検出することが可能である。そのため、融合遺伝子の存在が特徴的な肉腫などで有用な情報が得られる頻度が高いと期待される。DNA パネルの解析対象遺伝子数自体が、他のがん遺伝子パネル検査と比べても多く、また、染色体コピー数解析用のプローブの数も多く設計されているため、遺伝子変異・増幅も高い精度で詳細に解析可能である。また、遺伝子変異の総数が多くなることから、Hypermutator の検出感度も高くなると期待される。このように、TOP パネルは、DNA パネルおよび RNA パネルでの解析遺伝子数が 450 以上であること、日本独自の開発であり更なる発展性が期待されることなどの特徴を有している。また、正常ペア DNA 検体を解析することにより、生殖細胞系列変異の検出も可能である。

また大規模ながんゲノム研究が行われた結果、多数の臨床的意義不明な遺伝子変異 (variants of unknown significance: VUS) が報告されたが、それらが、がんに関連性を持つかは不明のままである。我々は、ハイスループットにそのような VUS の機能アッセイを行う手法 (mixed-all-nominated-mutants-in-one method: MANO 法) を新たに開発した。MANO 法では、変異遺伝子 cDNA それぞれに固有の 6 bp バーコードをつけ、3T3 や Ba/F3 などのアッセイ細胞に導入する。導入細胞を混合した後、当該遺伝子産物の阻害剤などと一定期間培養する。この培養の前後の細胞塊よりゲノム DNA を抽出し、6 bp バーコードを PCR にて増幅し、次世代シーケンサーで配列解析をすることで、各バーコード配列の数 (すなわち各遺伝子導入細胞数) の相対含量の変化が定量的に観察可能となる。本手法の有用性を検証するため、EGFR 遺伝子の VUS 約 100 種類について cDNA を調整後、MANO 法で Ba/F3 細胞に導入した。これらを混和後、ゲフィチニブ、オシメ

リチニブなど複数の EGFR 阻害剤の存在下で培養し、バーコードの数を次世代シーケンサーで計測した。この手法を用いて、肺腺がんで高頻度に見られる 101 種類の EGFR 遺伝子変異を評価したところ、64 種類ががん化能をもつ遺伝子変異であることが判明した。さらに、医療現場で使用されている、EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤に対して耐性を起こさせる変異を数多く発見した。以上より、VUS の機能検証に MANO 法が有効なことが証明され、また同時に、低頻度の VUS であっても臨床的意義付けを注意深く観察することが必要であることがわかった。

#### 【評価結果】

特に優れている

#### 【評価コメント】

高精度次世代シーケンサーによるがん臨床検体の変異遺伝子探索と変異遺伝子の機能スクリーニングを統合的に行うことにより、がんの本質的原因分子の同定を試み、目標を超える 12 種類の新規治療標的を見いだしたことは大きく評価できる。例えば、AYA 世代白血病における DUX4-IGH 融合遺伝子が、B 細胞性急性リンパ性白血病の発症に深く関与することを明らかにし、優れた治療標的であることを証明した。

今までの大規模なゲノム研究によって見いだされていた臨床的に意義不明の遺伝子変異の中から、がんのドライバー遺伝子変異を見つけ出すハイスループットな機能アッセイ法 (MANO 法) を確立した。本法を用いて肺腺がんにおいてがん化能を有する新規の EGFR 変異やチロシンキナーゼ阻害剤耐性変異を見いだしたことは大変意義深い。本法は競争優位性のある技術基盤であり、今後は新規標的遺伝子の探索への応用などの新たな展開も期待される。

また、450 以上の遺伝子変異・増幅を検出する DNA パネルと、650 以上の遺伝子融合転写産物等を検出する RNA パネルで構成された、がん遺伝子解析パネル (TOP パネル) を独自に開発した。本パネルは、融合遺伝子から特徴的な情報が得られる頻度が高い上皮性腫瘍や肉腫等の診断に効力を発揮することが期待される。

さらに臨床現場への知識の提供を視野に入れたがんゲノム医療用知識データベース「T-CanBase」を独自に開発した。

以上の研究成果をシステム化することは、がんゲノム医療のニーズである治療薬選択、遺伝カウンセリング、倫理支援などに大きく貢献することに繋がる。

なお、研究開発体制は多くの専門家集団から組織され、適切に機能していた。複数の特許出願を行い、知的財産の確保へ向けての努力も十分行われた。また、

企業への研究開発の導出活動も行われた。

今後は、同定したがんのドライバー遺伝子の治療標的適切性について、遺伝子改変を用いた疾患動物モデルの作成と治療実験による有用性の評価の実施などが期待される。一方、企業導出に至った成果はまだない。学術的成果が挙げてきたことから、社会還元の課題解決に向けて、創薬や新医療技術の創出に向けた開発段階への移行を本格的に図り、企業への導出やより緊密な連携を目指すなどの新たな戦略立案が重要である。将来的には、本事業で同定された新規治療標的に対する新規抗がん剤の創出が期待される。また、同定された遺伝子変異が免疫原性を有する変異蛋白を作り、がんワクチンなどが免疫療法の標的となる可能性についても研究の展開を期待したい。

以上